



TITLE:

HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Katagiri, Tomohiro

CITATION:

Katagiri, Tomohiro. HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog. 京都大学, 2018, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2018-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21257>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	片桐 幸大
論文題目	HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog （HIF-1 はソニックヘッジホッグの発現と分泌を亢進し、膵臓がん細胞とがん間質線維芽細胞の機能関係を調節する）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>膵臓がん組織は、他の悪性腫瘍組織と比較して“低酸素領域”と“がん間質線維芽細胞”に富むことを特徴とする。前者では低酸素誘導性転写因子（hypoxia-inducible factor 1：HIF-1）ががん細胞の低酸素適応応答を惹起することで、後者ではヘッジホッグシグナル伝達経路ががん間質線維芽細胞の増殖を促進することで、腫瘍の悪性形質と治療抵抗性が誘導されることが報告されているが、両者を結ぶメカニズムとその機能には不明な点が多い。本研究では、膵臓がん細胞株を低酸素条件下で培養した場合にヘッジホッグシグナル伝達経路のリガンド蛋白質（Sonic hedgehog protein：SHH 蛋白質）の細胞外分泌量が増加するという予備的知見を根拠に、『HIF-1 が膵臓がん細胞の分泌する SHH 蛋白質量を増加させ、がん間質線維芽細胞の増殖をヘッジホッグシグナル伝達経路依存的に促進し、膵臓がん特有の微小環境を形成している』との仮説を立て、以下の研究を行った。</p> <p>まず、種々の膵臓がん細胞株を通常酸素下および低酸素環境下で培養し、培養液中に分泌された SHH 蛋白質の量をウェスタンブロット法で比較したところ、確かに分泌量が低酸素環境下で増加していた。次に、膵臓がん細胞内での SHH の発現量が低酸素刺激の影響を受けるか否かを定量的 RT-PCR 法とウェスタンブロット法で検証した結果、SHH の発現量の増加が SHH の分泌量の増加の一因になることがわかった。さらに、酸素濃度の影響を受けないプロモーターの制御下で SHH を発現させた場合においても、細胞培養液中に分泌される SHH 蛋白質量が低酸素環境下で増加したことから、SHH の分泌効率もまた、低酸素環境下で亢進することが確認された。HIF-1 の主要制御サブユニット HIF-1 α をノックダウンした場合に、低酸素刺激による SHH の発現量と分泌効率の上昇が抑制された。さらに、HIF-1 α の恒常活性化型変異体 HIF-1 α 3A を膵臓がん細胞内で過剰発現させ、抗 HIF-1 α 抗体で共沈降してくる SHH プロモーターを定量的 RT-PCR で解析したところ、HIF-1 α タンパク質が SHH のプロモーター領域にリクルートされることが明らかになった。以上の結果から、低酸素環境に曝された膵臓がん細胞において、HIF-1 が SHH 蛋白質の発現と分泌効率を亢進することを明らかにした。</p> <p>次に、低酸素環境下で膵臓がん細胞が分泌した SHH 蛋白質が、がん間質線維芽細胞に及ぼす影響を解析した。ヘッジホッグ経路を構成する転写因子 GLI-1 依存的にルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を用いて検証したところ、低酸素環境下で膵臓がん細胞の分泌した SHH ががん間質線維芽細胞のヘッジホッグ経路を活性化することを確認した。また、この時、がん間質線維芽細胞の増殖能が誘導されることをも確認した。</p> <p>本研究の結果、低酸素環境に曝された膵臓がん細胞の中で、SHH 遺伝子の発現と SHH 蛋白質の細胞外分泌効率の双方が HIF-1 による上方制御を受け、分泌された SHH 蛋白質がパラクライン的ながん間質線維芽細胞のヘッジホッグ経路を活性化してその増殖を促進、そして最終的に、線維芽細胞に富む膵臓がんに特徴的な微小環境が形成されるという機序の存在が示され、HIF-1 と SHH が介在する“低酸素</p>			

がん細胞とがん間質線維芽細胞の機能的相互作用”を遮断することによって、放射線治療抵抗性や化学療法抵抗性を改善できる可能性が示唆された。
（論文審査の結果の要旨） 本研究は、低酸素環境下の膵臓がん細胞において、SHH（Sonic hedgehog）遺伝子の発現量の増加に加えて、SHH 蛋白質の細胞外分泌効率の亢進もまた、低酸素誘導性転写因子（hypoxia-inducible factor 1：HIF-1）に依存していることを示した。加えて、分泌量の増加した SHH 蛋白質が、パラクライン的ながん間質線維芽細胞のヘッジホッグ経路を活性化し、その増殖を促進することも示した。 具体的には、HIF-1 の主要制御サブユニットである HIF-1 α への抗体で共沈降してくる SHH プロモーターを定量的 RT-PCR で解析することにより、HIF-1 α タンパク質が SHH のプロモーター領域に結合していることを明らかにした。また、膵臓がん細胞において HIF-1 α をノックダウンした時に、低酸素刺激による SHH 発現量の上昇のみならず細胞外分泌効率の上昇も抑制されることを見出した。さらに、低酸素環境下で分泌量が増加した膵臓がん細胞由来の SHH タンパク質が、がん間質線維芽細胞のヘッジホッグ経路の活性を促進し、細胞増殖を加速させることを示した。 以上の研究は、低酸素環境下の膵臓がん細胞とがん間質線維芽細胞の間の、HIF-1 と SHH を介した機能的相互作用の重要性を明らかにしたのみならず、その相互作用の遮断により放射線治療抵抗性や化学療法抵抗性を改善できる可能性を示唆したものであり、今後の膵臓がんの治療成績の向上に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 4 月 27 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

